Butler

RECHERCHES

SUR LA DESTRUCTION DES MICROBES

PAR LES

CELLULES AMIBOÏDES DANS L'INFLAMMATION,

PAR LE Dr ARMAND RUFFER.

(Laboratoires réunis des Collèges royaux des médecins et des chirurgiens de Londres.)

Dans un mémoire publié dans le *British medical Journal*[1], j'ai été conduit aux conclusions suivantes :

1° Les phénomènes inflammatoires, consécutifs à l'introduction du bacille du charbon symptomatique sous la peau du cobaye, ont un caractère protectif et utile :

2° La destruction des microbes au point d'inoculation est produite entièrement par les cellules amiboïdes, contenues dans l'exsudat inflammatoire.

Ces conclusions étaient basées sur des expériences faites avec des cobayes ; mais depuis j'ai étudié l'action du même virus du charbon symptomatique sur les lapins, animaux regardés comme réfractaires à cette maladie (Arloing, Cornevin et Thomas, Roux et Nocard, etc.). Dans ce qui va suivre, je me propose de

1. *British medical Journal*, 24 mai 1890.

donner un compte rendu d'expériences entreprises pour examiner l'effet qu'exercent les humeurs vivantes et les cellules des lapins sur le *bacillus Chauvæi*.

Les virus employés étaient le 1er et le 2e vaccins de M. Arloing, vaccins préparés par la dessiccation des muscles d'animaux morts du charbon symptomatique. La dose du virus était toujours soigneusement pesée avant d'être introduite sous la peau du lapin.

Ma première expérience me porta à croire que le *bacillus Chauvæi* ne se cultive pas dans les humeurs vivantes du lapin. Ayant introduit une petite quantité du 2e vaccin (0gr,005) sous la peau d'un lapin avec les précautions antiseptiques nécessaires, j'examinai le point d'inoculation 24 heures après, et ne pus constater la présence d'aucun bacille sur les préparations étalées, faites avec l'humeur prise en ce point. Cependant en colorant soigneusement des coupes, faites avec le tissu inflammatoire excisé au niveau de l'injection, je trouvai toujours quelques leucocytes, entourant les débris de la poudre vaccinale, et quelques bacilles typiques englobés dans des cellules. Si, au lieu d'injecter une si petite quantité de vaccin, j'en inoculais une plus grande (0gr,05), les bacilles étaient extrêmement nombreux au point d'inoculation. Des doses un peu plus fortes donnaient à l'animal le charbon symptomatique typique, et le tuaient inévitablement après 48 heures ou en trois jours. On constatait alors, au point d'inoculation, un très grand nombre de bacilles dont beaucoup étaient englobés dans les leucocytes et en voie de dégénérescence. Les changements dégénératifs de ces microbes étaient tout à fait semblables à ceux produits par les leucocytes des cobayes [1].

Deux faits sont nettement établis par ces expériences :

1° L'immunité du lapin vis-à-vis du *bacillus Chauvæi* est seulement relative et non pas absolue;

2° Cette immunité relative n'est pas due seulement au manque de matière nutritive, car pourvu que la dose de virus introduit soit assez grande, le bacille se cultive très bien dans les tissus du lapin.

Ces faits me conduisirent à rechercher si les humeurs

1. Voir *British medical Journal*, loco citato.

vivantes des animaux, comparativement réfractaires au *bacillus Chauvæi*, avaient un pouvoir bactéricide sur ce même microbe, quoique cette question ait déjà été, à un certain point, élucidée par les excellentes recherches de mon ami M. Roger. Cet observateur éminent, fermement convaincu du pouvoir bactéricide et immunisant du sérum, a fait l'observation remarquable [1] que le sérum des cobayes, qui ne sont pas *réfractaires* au charbon symptomatique, a un fort pouvoir bactéricide envers le *bacillus Chauvæi*, tandis que le sérum des lapins, animaux relativement réfractaires, est inoffensif pour le même bacille. C'est là une confirmation de plus de ce fait qu'on ne peut pas juger de l'immunité d'un animal vis-à-vis d'une maladie, par le pouvoir bactéricide de ses humeurs mortes vis-à-vis du microbe de cette maladie.

J'ai déjà signalé autre part [2] le fait que, de même que le sang vivant diffère du sang mort par ses caractères optiques, chimiques et physiologiques, l'action des humeurs *vivantes* sur les microbes diffère complètement de celle des humeurs mortes.

En partant de ce principe que, pour étudier l'action des humeurs de l'économie sur un microbe, il faut observer cette action dans l'organisme vivant, j'ai adopté une méthode employée antérieurement pour des expériences de même ordre par Metchnikoff et d'autres. Je renfermais la poudre à étudier dans un petit sac de papier à filtrer, fait comme ceux dont les pharmaciens se servent pour envelopper leurs poudres. Les deux replis du sac étaient seulement scellés l'un dans l'autre avec de la paraffine.

Je mettais dans le sac $0^{gr},5$ du 1er vaccin, et j'introduisais le tout, pendant 24 ou 48 heures, sous la peau d'un gros lapin. Je retirais ensuite le sac, j'examinais son contenu, et je plongeais le tout dans de l'alcool absolu pour le bien durcir.

L'aspect des préparations étalées, faites avec le contenu du sac, variait quelque peu. Si la préparation était faite avec la poudre contenue au centre du petit paquet, les nombreux bacilles qui s'étaient développés étaient, pour la plus grande partie, normaux, quoique la croissance de quelques-uns d'entre eux fût moindre que celle de leurs voisins. Les contours de

1. *Contribution à l'étude de l'immunité acquise*, page 1
2. *British medical journal*, 24 mai 1890.

ces derniers bacilles étaient irréguliers, et leur coloration par la méthode de Gram moins intense, et souvent remplacée en partie par la coloration complémentaire de la vésuvine. Assez fréquemment on observait de longs filaments, dans lesquels quelques bacilles paraissaient parfaitement normaux et se coloraient en violet foncé par le violet de gentiane, tandis que d'autres avaient des contours irréguliers et se coloraient par la vésuvine.

Il est difficile de décider si les bacilles à contours irréguliers étaient en voie de dégénérescence, ou si on avait affaire à des microbes dont la croissance avait simplement été retardée. Cependant la seconde hypothèse me semble être la vraie, pour les raisons que voici.

Si on examine la poudre 48 heures après l'inoculation, ces formes irrégulières, au lieu d'être plus nombreuses, ne se rencontrent que rarement et peuvent même faire complètement défaut. Enfin si, au lieu d'examiner la portion centrale de la poudre, on étudie la raclure faite sur la surface du papier, on y trouve une quantité de bacilles courts, droits, épais et absolument normaux.

On rencontre par-ci par-là, à l'intérieur du sac, quelques leucocytes. C'est un fait important, car il réfute complètement l'objection faite à cette méthode, notamment que quelques-unes des matières chimiques bactéricides contenues dans le liquide exsudé, sont arrêtées par le papier. Il est certain que si un corps solide, tel qu'un leucocyte, peut traverser le papier, aucune substance chimique ne peut être retenue. On peut donc déjà conclure de ce qui précède que le *bacillus Chauvæi* se développe parfaitement dans les tissus des lapins réfractaires. La preuve de ce fait devient absolue si on fait soigneusement des coupes du papier du sac, après l'avoir durci dans l'alcool, le chloroforme, le chloroforme saturé de paraffine et enfin la paraffine pure [1].

L'examen de ces coupes démontre une grande activité des bacilles, car on voit qu'ils parviennent à se frayer un passage entre les fibres du papier et le traversent jusqu'à une certaine distance. D'un autre côté, les leucocytes, attirés par le poison

1. Ces coupes sont très difficiles à faire. Elles ont été faites et colorées au carmin et au violet, avec un très grand succès, par mon ami le Dr. J. H. Walker de Corwen.

sécrété par les microbes, pénètrent en quantité immense à travers les fibres du papier, de sorte qu'une rencontre entre les microbes et les leucocytes doit avoir inévitablement lieu à un certain point.

On voit alors que quelques leucocytes, ayant pris les devants, contiennent des microbes soit normaux, soit en voie de dégénérescence. D'autre part beaucoup de ces leucocytes ont eux-mêmes péri dans la lutte, comme on le voit clairement d'après les signes de dégénérescence qu'ils manifestent. Derrière cette avant-garde on trouve la masse des leucocytes contenant dans leur intérieur une masse énorme de bacilles plus ou moins dégénérés. Il est curieux de voir les petits leucocytes polynucléaires rassemblés en nombre énorme, juste aux endroits où leur présence est utile. Enfin, près de la surface externe de la coupe on ne trouve plus un seul bacille. Tous ont été arrêtés par les leucocytes.

L'observation suivante est digne d'intérêt à un autre point de vue. Ayant inoculé un lapin avec $0^{gr},005$ du 1er vaccin du charbon symptomatique enveloppé dans un sac en papier, je fus empêché de venir au laboratoire pendant quelques jours. En revenant le sixième jour, je trouvai l'animal en bon état.

Le sac en papier ainsi que les tissus environnants furent enlevés, durcis dans de l'alcool absolu et j'en fis des coupes, que je colorai par le carmin de M. Gerrard et le violet de gentiane. Je ne parvins à trouver aucun bacille dans toutes les coupes examinées. La cavité du sac était pourtant très reconnaissable, car elle contenait les débris de la poudre vaccinale et de nombreuses cellules amiboïdes, tandis que le tissu connectif nouveau s'était développé sur la surface externe du papier.

Je n'ai pas besoin de faire ici la description des microphages (petites cellules mono et polynucléaires) et des macrophages (grandes cellules ne contenant qu'un noyau vésiculaire) qui avaient envahi le papier. Il suffit de dire, que, contrairement aux descriptions de MM. Ballance et Sherrington [1], j'ai observé tous les stades de développement depuis les leucocytes jusqu'aux grandes cellules épithélioïdes. Le développement de ces cellules plasmiques, dans les productions *pathologiques*, est absolument

1. Sur la formation du tissu cicatriciel, *Journal de Physiologie*, 1889, p. 855

identique au développement de ces mêmes cellules tel que je l'ai observé dans les tissus normaux (rate, ganglions lymphatiques, plaques de Peyer, amygdales, etc.). Non seulement le développement, mais la fonction de ces cellules épithélioïdes pathologiques ressemble à celle des cellules épithélioïdes physiologiques. Comme dans la rate et les ganglions lymphatiques normaux, de même dans le sac en papier introduit sous la peau, les macrophages englobent un grand nombre de petits leucocytes.

Outre les cellules mononucléaires, je trouvai dans le papier à filtrer, de vraies cellules géantes multinucléaires, ressemblant en tout aux cellules correspondantes de la tuberculose. Elles étaient formées par la fusion de plusieurs cellules épithélioïdes, et leur fonction paraissait être exactement la même que celle de ces cellules.

En examinant en effet soigneusement les cellules géantes, je vis que quelques-unes d'entre elles renfermaient des corps particuliers brillants, homogènes, irréguliers, jaunâtres, ne ressemblant en rien à quoi que ce soit appartenant à l'économie animale. Ces masses irrégulières n'étaient rien autre que du papier à filtrer englobé et en partie digéré par les cellules géantes. En certains endroits notamment, ces énormes macrophages avaient été fixés par le réactif, juste au moment où ils étaient en train d'absorber les fibres du papier ; on pouvait alors observer la cellule géante englobant presque entièrement une fibre, dont une partie faisait encore saillie. Ce nouveau fait, ajouté à ceux décrits antérieurement par Soudakevitch, Metchnikoff et moi-même, démontre une fois de plus que la cellule géante n'est pas un corps affaibli et malade (Weigert, Koch), mais une cellule amiboïde excessivement active et utile, — une cellule de combat.

Il était très important de savoir si le second vaccin était encore affaibli sous l'influence des humeurs vivantes du lapin. Les expériences suivantes furent faites à ce sujet.

On divisa en trois parties égales $0^{gr},15$ du 2e vaccin. $0^{gr},05$ furent inoculés à un lapin (A). Il se développa chez cet animal une tumeur absolument typique, qui pourtant disparut graduellement, et le lapin se rétablit complètement.

$0^{gr},05$ de vaccin furent enveloppés dans du papier à filtrer

et placés sous la peau d'un autre lapin (B). 24 heures après, on ouvrit la plaie et on incisa le papier, de manière à laisser le contenu s'échapper dans les tissus. Le lapin mourut, 48 heures après, du charbon symptomatique typique.

On introduisit 0gr,05 sous la peau d'un 3e lapin (C), de la même manière. 44 heures après l'introduction du sac, celui-ci fut rompu par la pression faite à travers la peau. Cet animal succomba 24 heures après au charbon symptomatique.

Afin de démontrer que ce résultat n'était aucunement dûà ce que le virus avait été introduit dans un endroit affaibli par la présence du papier à filtrer, l'expérience suivante fut entreprise.

On mit, sous la peau d'un lapin, un sac en papier renfermant 0gr,05 du 2e vaccin, c'est-à-dire une dose non mortelle ; 24 heures après, on retira le sac, et son contenu fut introduit sous la peau d'un lapin bien portant. Celui-ci succomba en moins de deux jours au charbon symptomatique.

Une dose de 0gr,0001 du 2e vaccin, dose qui, comme je m'en étais assuré antérieurement, donne au cobaye une maladie bénigne et non mortelle, fut enveloppée dans du papier à filtrer et placée sous la peau d'un lapin; 24 heures après on inocula le contenu du sac à un cobaye. Cet animal succomba au charbon symptomatique en moins de 48 heures.

On introduisit de la même manière 0gr,0005 du 2e vaccin sous la peau d'un lapin, et 24 heures après, on transporta la poudre inoculée sous la peau d'un cobaye ; celui-ci succomba en moins de 24 heures.

Une autre objection qu'on pourrait faire à ces expériences est qu'en laissant le virus se développer pendant quelque temps dans l'organisme, et le transportant ensuite sur un second animal, j'injectais à celui-ci non seulement le virus primitif, mais encore les toxines déjà sécrétées dans l'intérieur des tissus, et que ces substances chimiques renforçaient l'effet du virus.

Je démontrerai amplement plus tard que ce n'est pas à cette cause qu'il faut attribuer la virulence plus grande du *bacillus Chauvæi*.

Revenons maintenant à la description des phénomènes observés chez les lapins inoculés avec le charbon symptomatique.

Nous avons vu qu'il était extrêmement difficile de trouver les bacilles au point d'inoculation, quand on n'avait introduit qu'une petite quantité de virus, 24 heures après l'opération; d'un autre côté, la même quantité ($0^{gr},0005$) du 2e vaccin se développe parfaitement, pourvu qu'elle soit convenablement enveloppée dans du papier.

Au lieu d'examiner le point d'inoculation 24 heures après l'injection, examinons-le 3 ou 4 heures après.

On voit alors que beaucoup de bacilles se sont développés, mais que presque aussitôt ils ont été pour la plupart englobés par les leucocytes. Et, 24 heures après l'inoculation d'une petite quantité de virus, ils ont presque tous été détruits par les cellules migratrices.

Les phénomènes sont complètement différents si on injecte une quantité de virus suffisante pour produire une tumeur charbonneuse, sans nécessairement provoquer la mort de l'animal.

Comme chez le cobaye, il se forme au point d'inoculation une exsudation rouge sanguinolente qui contient de nombreux leucocytes remplis de bacilles. Après quelques jours, la paroi de l'abcès, souvent si bien limitée que l'on peut facilement la séparer des tissus environnants, est composée d'une quantité innombrable de leucocytes contenant des bacilles dans leur intérieur. Les bacilles diminuent graduellement de la paroi interne à la paroi externe, et finissent par disparaître complètement.

Mais quoique les bacilles soient limités au point d'inoculation, l'œdème occupe cependant une surface considérable. L'exsudation est d'un jaune pâle, sans être mélangée de sang, et s'étend le long des plans musculaires. Chez un lapin, inoculé au flanc, par exemple, l'exsudation séreuse peut s'étendre depuis le point d'inoculation jusqu'à la symphyse de la mâchoire inférieure, aux aisselles et aux muscles des jambes, et postérieurement jusqu'aux genoux et même plus bas. Une énorme quantité de liquide, jusqu'à 50 centimètres cubes, s'écoule après la mort. On n'observe pas de *crépitation* dans la tumeur, et l'examen du liquide exsudatif démontre qu'il ne contient point ou extrêmement peu de bacilles.

Les phénomènes sont très différents chez les lapins comme chez les cobayes, si on inocule un virus renforcé par un séjour sous la peau d'un autre animal. Les muscles au point d'inocu-

lation sont alors d'un rouge pourpre, flasques et pulpeux. Cet état des muscles s'étend à une certaine distance autour du point d'inoculation, mais jamais on ne voit une quantité d'exsudat séreux aussi grande que dans la forme chronique que je viens de décrire.

On trouve bien quelques leucocytes au point d'inoculation, et quelques-uns d'entre eux peuvent contenir une petite quantité de bacilles, mais la phagocytose est bien moins marquée que dans les cas chroniques, et le nombre des bacilles au point d'inoculation est proportionnellement augmenté. De plus, il n'est pas rare de trouver de nombreux bacilles dans les muscles, la rate, le foie et, chez les cobayes, même dans le sang du cœur.

Comme nous allons le voir, on peut donner au lapin un charbon symptomatique qui le tue en moins de 24 heures. Dans ces cas si aigus, on ne trouve point du tout de leucocytes au point d'inoculation quoiqu'il y ait un exsudat rouge abondant, dans lequel le *bacillus Chauvæi* se cultive très bien.

Charrin[1] a avancé que, dans les maladies infectieuses, le virus qui les provoque s'atténue graduellement dans les humeurs des animaux qui guérissent de cette maladie, et a démontré qu'il en était ainsi pour la maladie pyocyanique. Pourtant, sans vouloir critiquer les belles expériences de ce savant, je ne crois pas que cela soit une règle générale et qu'il en soit ainsi pour la maladie produite par le *bacillus Chauvæi*. Les expériences suivantes le prouvent.

Lapin (A) inoculé avec 0gr,05 du 2e vaccin. On lui introduit sous la peau un petit sac en papier contenant 0,001 du premier vaccin, qu'on place de manière à ce qu'il soit entouré par la poudre du 2e vaccin, inoculé antérieurement. Deux jours après, on sacrifie le lapin (A) par le chloroforme; sa température avait oscillé entre 38°,3 et 39°,4. Toute la paroi de l'abcès fut raclée et injectée en masse sous la peau d'un cobaye (*a*). Le sac fut soigneusement ouvert et une trace de son contenu placée sous la peau d'un autre cobaye (*b*). Le premier (*a*) des deux cobayes fut très malade, mais guérit finalement, tandis que le second (*b*) succomba au charbon symptomatique en moins de 48 heures.

1. Cité par Bouchard, *Essai d'une théorie de l'infection*. Berlin, 1890.

Un lapin blanc (B) fut inoculé de la même manière que le lapin (A), et l'expérience ne fut modifiée qu'en ce que le sac en papier stationna sous la peau pendant quatre jours. Le cobaye, inoculé avec la paroi de l'abcès, mourut en 2 jours, tandis que l'autre, inoculé avec une trace du contenu du sac, succomba 12 heures avant.

Un autre lapin (C) fut inoculé de même, et le sac en papier resta pendant 6 jours sous la peau. Un cobaye, inoculé avec la paroi de l'abcès, mourut après 5 jours, tandis que le contenu du sac en papier tua un cobaye en moins de 36 heures.

Une expérience, dans laquelle je voulais laisser plus de 6 jours le sac en papier sous la peau, n'aboutit pas, à cause de la rupture du sac; mais il est à noter que ce lapin succomba au charbon symptomatique. On voit en résumé qu'il n'y eut aucune atténuation du 1er vaccin, quoiqu'il ait été baigné pendant plusieurs jours dans les liquides de l'abcès charbonneux.

Il était important de savoir aussi si les humeurs vivantes des lapins, dont l'immunité avait été renforcée par une inoculation antérieure du virus, avaient un pouvoir bactéricide sur le *bacillus Chauvæi*. Dans ce but je choisis deux lapins qui avaient, un mois avant, résisté à l'inoculation de 0gr,05 du 1er vaccin. On introduisit sous la peau d'un premier lapin un sac en papier contenant 0gr,01 du 2e vaccin, qu'on y laissa pendant 24 heures. Une trace de son contenu, inoculée à un cobaye, le tua en moins de 24 heures. Un autre sac en papier contenant la même dose du second vaccin fut inoculé à l'autre lapin et laissé sous la peau pendant 48 heures. Une minime quantité de son contenu tua un cobaye en moins de 36 heures.

Il a été démontré dans cet article, ainsi que dans un précédent sur le même sujet, que dans le charbon symptomatique les leucocytes se rassemblent au point d'inoculation, dès que les bacilles commencent à se développer.

Dans mon premier article, je n'ai pas donné l'explication de ce fait, quoique je me fusse efforcé d'élucider cette question; mais depuis les admirables recherches de Leber, Massart et Bordet, Gabritchevsky et Buchner, ont démontré que les poisons chimiques, sécrétés par les microbes, attirent les leucocytes à l'endroit de l'inoculation.

Je puis confirmer ces recherches quant au poison du charbon symptomatique, quoique mon mode d'expérimentation fût un peu différent de ceux qui ont été déjà usités.

Les humeurs contenues dans les muscles environnant le point d'inoculation d'un lapin mort du charbon symptomatique furent filtrées sur un filtre Chamberland. Une éponge stérilisée fut baignée dans ce liquide filtré et fut placée, avec un morceau d'une autre éponge pure et stérilisée, sous la peau d'un lapin. Les deux éponges furent retirées et examinées après trois heures.

Il fut alors constaté que le morceau d'éponge pure ne contenait presque pas de leucocytes, tandis que celui imprégné par l'humeur filtrée en contenait une quantité innombrable.

Dans quelques maladies, au moins dans les maladies mortelles, les leucocytes perdent leur pouvoir d'émigrer pour se rendre au point irrité. De plus, M. Bouchard[1] a montré que certaines sécrétions microbiennes injectées à un animal, supprimaient la diapédèse. Les expériences suivantes confirment les expériences de M. Bouchard.

On sait que l'inoculation du bacille pyocyanique provoque une émigration de leucocytes au point d'inoculation. De plus, Charrin[2] a prouvé que si l'on introduit 0,25^{cc} d'une culture fraîche et virulente du bacille pyocyanique dans une veine d'un lapin, cet animal succombe en 24 heures à une affection aiguë. A l'autopsie, on trouve le bacille pyocyanique dans tous les organes, le foie, la rate, les poumons, etc.; mais les microbes sont libres dans les humeurs, ils ne sont pas englobés par les cellules. L'expérience suivante montre que chez un animal atteint de la maladie pyocyanique les leucocytes sont incapables de sortir des vaisseaux pour attaquer le bacille.

Un lapin fort et bien portant (A) fut inoculé dans la veine marginale de l'oreille avec 0,1^{cc} d'une culture de bacille pyocyanique. 5 heures après, à 5 heures du soir, on inocula à cet animal, ainsi qu'à un autre lapin (B) de la même dimension, une goutte d'une culture du bacille pyocyanique dans la

1. Bouchard, *loc. cit.* Page 11.
2. Charrin, *la Maladie pyocianique.*

chambre antérieure de l'œil. Dans les deux cas, l'iris fut légèrement lésé, et une petite quantité de l'humeur inoculée s'échappa au moment où l'on retirait l'aiguille.

Le lendemain, à 2 heures, le premier lapin était mourant. L'examen de l'œil inoculé démontra une faible inflammation de l'iris, strictement limitée au point où l'aiguille l'avait lésé. La cornée n'était que légèrement opaque, et le liquide de la chambre antérieure contenait une culture pure du bacille pyocyanique, ainsi qu'une très petite quantité de leucocytes. Il n'y avait pas de conjonctivite. L'état de l'œil de l'autre animal était très différent. On y voyait tous les symptômes classiques d'une iritis intense : la cornée était opaque, la chambre antérieure était remplie de leucocytes émigrés dont beaucoup contenaient une quantité de bacilles, et la conjonctive était visiblement congestionnée. L'animal avait l'air tout à fait bien portant, était vif et ne semblait pas souffrir. Il fut sacrifié par le chloroforme.

On ne trouva de bacilles dans aucun de ses organes; les humeurs du foie, du poumon, du cœur, des reins, etc., ensemencées sur gélatine, ne donnèrent pas de cultures.

M. Charrin a démontré qu'une culture du bacille pyocyanique, injectée sous la peau d'un lapin, provoque une forme plus lente de la maladie, qui peut durer 4 à 5 jours. J'injectai 2 centimètres cubes de culture du bacille pyocyanique sous la peau à la base de l'oreille d'un lapin, et, 6 heures après, j'inoculai, ainsi qu'à un témoin, une goutte de la même culture dans la chambre antérieure. Tandis que chez le témoin il survint aussitôt une inflammation de l'œil, celle-ci fut ajournée chez l'autre lapin. L'exsudation leucocytaire n'était que peu marquée le second jour : elle augmenta légèrement pendant le troisième et le quatrième, et ce n'est que dans la septième journée qu'elle s'éleva au même degré d'intensité que chez le témoin.

Après cette expérience, je voulus naturellement voir si l'inflammation produite par le bacille pyocyanique était retardée ou supprimée dans le cas où l'animal avait une maladie infectieuse pendant laquelle les leucocytes sont inactifs, comme le charbon par exemple. Je pus m'assurer que les leucocytes du cobaye ou du lapin, qui ne sont pas en état d'englober une seule bactéridie charbonneuse, émigraient librement et englobaient

de nombreux bacilles pyocyaniques quand on injectait sous la peau d'un animal charbonneux une culture de ce microbe. Je reviendrai sur ce fait important en terminant mon article.

Étudions maintenant ce qui arrive quand on entrave l'émigration leucocytaire chez un animal inoculé avec le charbon symptomatique. M. Arloing a démontré le premier que le charbon symptomatique ayant perdu sa virulence, peut être renforcé par l'addition d'acide lactique, et attribue ce phénomène à l'action directe de l'acide sur le virus. MM. Roux et Nocard[1], qui répétèrent cette expérience, expliquèrent le fait par l'action directe de l'acide sur les tissus.

Dernièrement, MM. Vaillard et Vincent[2] ont avancé que, chez les animaux inoculés du tétanos, l'acide lactique augmentait la virulence du microbe de Nicolaïer, et MM. Massart et Bordet[3] ont prouvé que cet acide a une propriété négativement chimiotaxique.

Je suis arrivé aux mêmes conclusions que ces savants mais par une autre voie. J'introduisais deux petites pelotes de coton sous la peau d'un cobaye; mais, tandis que l'une d'elles était stérile, l'autre avait été plongée pendant 2 heures dans une solution d'acide lactique au dixième. Les pelotes furent retirées après 6 heures, leur contenu étalé sur des lamelles qui furent séchées soigneusement et colorées par le bleu de Loeffler. Le résultat obtenu fut très intéressant : car tandis que la pelote normale contenait des leucocytes, l'autre, qui avait été plongée dans l'acide lactique, n'en contenait absolument pas.

Depuis cette expérience, j'ai examiné une série de corps qui possèdent tous la chimiotaxie négative. Je citerai l'iode, le sublimé, l'acide phénique, la térébenthine, le xylol.

Il restait encore à prouver que l'action de l'acide lactique est la même si on injecte le charbon symptomatique en même temps.

On introduisit deux petits sacs en papier ouverts à une extrémité et contenant chacun $0^{gr},005$ du 1er vaccin du charbon symptomatique; mais tandis que l'un (A) ne contenait pas d'acide lactique, l'autre (B) avait été plongé, ainsi que la poudre,

1. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1887, p. 257.
2. *Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1891.
3. *Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1891.

pendant une heure, dans une solution d'acide lactique au dixième. Le sac (A) fut introduit dans le flanc droit; le sac (B), contenant le virus imprégné d'acide lactique, dans le flanc gauche. 24 heures après, on put facilement observer une petite tumeur du côté gauche, tandis que le flanc droit paraissait normal. On sacrifia alors l'animal par le chloroforme, et les tissus environnant le point d'inoculation furent examinés sur des préparations étalées et sur des coupes.

Autour du sac A, il y avait de nombreux leucocytes, dont beaucoup contenaient des bacilles ainsi qu'un assez grand nombre de bacilles libres. Les muscles environnants étaient presque normaux et il n'y avait pas d'œdème notable.

Du côté opposé, le liquide entourant directement le sac ne contenait que très peu de leucocytes dont la majorité était vide, et dans le sac même il n'y avait que très peu de leucocytes qui ne contenaient pas de bacilles. Les muscles environnants étaient enflés, mous, gélatineux et laissaient échapper une grande quantité d'un liquide où fourmillaient des bacilles libres, mais très peu de leucocytes. Les muscles du flanc gauche avaient cet aspect sur toute l'étendue limitée par la ligne médiane, l'aine et l'épaule, et contenaient des bacilles innombrables.

J'ai montré que les toxines sécrétées par les bacilles de Chauveau avaient une propriété chimiotaxique positive. D'autre part, M. Roger a prouvé que si les toxines du *bacillus Chauvæi* étaient injectées dans les veines en même temps que le virus était introduit sous la peau, la maladie se terminait par la mort, même chez les lapins réfractaires.

Les résultats de M. Roger sont parfaitement exacts, mais il ne faut pourtant pas en conclure que les leucocytes soient paralysés par les toxines injectées dans les veines.

En premier lieu, les toxines contenues dans le liquide près du point d'inoculation, loin de paralyser les leucocytes, exercent une action stimulante sur ces cellules. — De plus, les expériences suivantes prouvent que les toxines, sécrétées par le bacille de Chauveau, et introduites dans les veines, ne paralysent nullement les leucocytes.

Un lapin fut inoculé dans le flanc avec 10 gouttes du liquide exsudatif pris au point d'inoculation d'un cobaye, mort après

avoir été inoculé avec le *bacillus Chauvœi*. L'inoculation simultanée des toxines et des bacilles n'avait aucunement paralysé les leucocytes, car l'animal ne mourut pas.

Un autre lapin fut inoculé dans les veines avec 10 gouttes du même liquide, sans aucun résultat apparent. Ici aussi il paraît ne pas y avoir eu de paralysie des leucocytes, quoique les bacilles et les toxines aient été injectés en même temps.

Un troisième lapin fut inoculé avec 5 gouttes du même liquide dans les muscles de la jambe droite, et 5 gouttes dans les veines. 15 heures après, cet animal fut trouvé mort avec une énorme tumeur au point d'inoculation du virus. Ce point, soigneusement excisé et durci, ainsi que la rate, le foie, les reins, les poumons et le cœur, furent examinés sur des coupes colorées par le carmin et la méthode de Gram.

On trouva alors qu'au point d'inoculation les fibres musculaires étaient séparées par le liquide exsudatif, contenant par endroits une quantité énorme de bacilles, *mais pas un seul leucocyte*.

Le cœur, les reins et les poumons ne contenaient pas de bacilles. Dans la rate on en trouvait quelques-uns, tous dans de grands macrophages, et en voie de dégénérescence. Les cellules hépatiques n'en contenaient pas, mais les grands macrophages qui sont toujours présents dans les vaisseaux du foie et les microphages renfermaient souvent un grand nombre de bacilles. Nulle part je ne parvins à trouver des bacilles libres dans le sang.

Il ressort clairement de ces expériences que quoique les leucocytes ne fussent nullement paralysés, puisqu'ils absorbaient les bacilles contenus dans les vaisseaux, ils ne traversaient pas les parois vasculaires pour détruire les bacilles qui se trouvaient dans le tissu sous-cutané.

A quoi attribuer cette inactivité des leucocytes? J'avais d'abord pensé, guidé en cela par les belles recherches de MM. Charrin et Gley[1], à des modifications vasculaires, mais je dus bientôt me convaincre que les leucocytes, quoique se refusant d'émigrer pour combattre les bacilles au dehors des vaisseaux, sortaient promptement s'ils avaient un autre objet

1. *Archives de physiologie*, octobre 1890.

d'attraction. En répétant la dernière expérience et en inoculant en même temps le bacille pyocyanique dans l'oreille, je trouvais, 6 heures après, le point d'inoculation du bacille pyocyanique envahi par les leucocytes. Ces cellules amiboïdes émigrées étaient extrêmement actives et voraces, tandis qu'on n'en voyait point du tout au point d'inoculation du bacille du charbon symptomatique.

Dans mon premier article j'avais émis l'opinion que de ce que les humeurs mortes d'un animal étaient bactéricides, il n'en fallait pas conclure qu'il en était de même pour les humeurs vivantes. J'aurais alors pu ajouter que le sang mort d'un animal a une influence extrêmement toxique pour l'animal même duquel il a été retiré.

Dans une leçon remarquable faite à l'Institution Royale de Londres le professeur Klein[1] a fait une étude critique de toute la question des phagocytes, et attribue l'immunité de certains animaux contre certaines maladies infectieuses à l'action bactéricide des humeurs.

Après avoir cité la description que Metchnikoff a donnée de la destruction des bacilles du charbon par les leucocytes quand le virus est introduit dans la cavité lymphatique de la grenouille, le docteur Klein poursuit ainsi : « Il paraît très étrange de chercher là une explication suffisante de l'état réfractaire de la grenouille envers le charbon, car il faut considérer que les bacilles, comme les autres corps minuscules, injectés dans le sac lymphatique, doivent être absorbés et entraînés dans la circulation sanguine en quelques minutes, même en quelques secondes, dans tous les cas des heures avant que les phagocytes aient eu le temps de se rassembler en quantité suffisante dans le sac lymphatique pour engager une lutte avec les bacilles. »

Cet argument ne me semble pas avoir le poids que M. Klein semble lui attribuer. En premier lieu, quand on examine l'humeur du sac lymphatique de la grenouille on y trouve toujours de nombreux phagocytes.

Secondement, quand on injecte dans le sac lymphatique d'une grenouille des poudres fines, de vermillon par exemple,

1. *Nature*, avril 1891.

de charbon ou de tournesol, les particules sont absorbées par l'intermédiaire des leucocytes, mais nullement avec rapidité. En injectant par exemple une goutte de solution saline, contenant du tournesol finement pulvérisé, dans le sac lymphatique de la grenouille, je retrouvais facilement la poudre le lendemain. Une partie en était contenue dans les leucocytes et une autre était libre entre les cellules. On trouve donc dans le sac lymphatique de la grenouille des leucocytes prêts pour la lutte. De plus les particules solides ne sont pas absorbées aussi rapidement que le suppose M. Klein.

Plus loin on lit le passage suivant : « Il a été abondamment prouvé que dans certains cas les bacilles entrent réellement dans la circulation sanguine, mais qu'ils y sont détruits non pas par les leucocytes, mais par la partie liquide du sang, le plasma ; il a aussi été prouvé que les parties liquides du sang et de la lymphe en général ont une action bactéricide très marquée, indépendamment des éléments cellulaires, leucocytes ou autres cellules. »

Le Dr Klein ne fait aucune différence entre l'action du sérum vivant et celle du sérum mort, et comme il ne cite pas les faits sur lesquels il base ses conclusions, je ne puis les discuter. Mais il me semble pourtant que tous les travaux faits sur ce sujet pendant ces dernières années, mettent hors de doute l'action des éléments cellulaires du sang.

D'après M. Klein, on peut donner l'explication suivante des faits avancés par Metchnikoff : « Les bacilles ne peuvent exister dans le liquide lymphatique et sanguin ; ils y sont détruits, mais ils se réfugient dans les leucocytes et les cellules lymphatiques où ils peuvent vivre. » Mais après un certain temps, « la substance des cellules lymphatiques suspendues dans la lymphe ou le plasma sanguin s'imprègne de la substance bactéricide des humeurs et alors les microbes meurent bientôt, même dans les cellules ». Et pour corroborer son point de vue, M. Klein continue : « L'action bactéricide du sang d'un animal envers une maladie donnée est grande quand l'animal est réfractaire pour le microbe pathogène qui la produit, mais elle est faible si l'animal n'est pas réfractaire à ce microbe. »

On peut pourtant objecter à ceci, que Metchnikoff a vu que les humeurs vivantes des pigeons, des rats et des chiens, animaux plus ou moins réfractaires envers le charbon, étaient

d'excellents milieux de culture pour la bactéridie charbonneuse. On peut dire aussi d'autre part que le sang mort des animaux qui ne sont point réfractaires pour un microbe donné, est souvent un mauvais milieu de culture pour ce dernier, comme l'ont démontré les travaux de MM. Charrin et Roger. La dernière partie de l'objection de M. Klein doit être basée sur une interprétation erronée des faits.

Néanmoins la première partie de ses arguments demande à être soigneusement discutée.

M. Klein admet que les bacilles périssent au dedans des leucocytes, mais il croit que la substance bactéricide, dont il admet la présence dans le sang et la lymphe, pénètre dans les leucocytes et exerce alors son effet curatif.

Pourtant il n'est nullement prouvé que les leucocytes se laissent pénétrer par toutes les substances chimiques qui les entourent.

On sait que si l'on injecte dans la circulation des particules solides comme le carmin, le vermillon ou une autre poudre quelconque, certaines cellules englobent la poudre jusqu'à éclater tandis que d'autres refusent d'y toucher. De même il a été nettement établi que les cellules des reins, du foie, des intestins, etc., absorbent certaines substances chimiques, tandis qu'elles en rejettent d'autres. L'expérience suivante prouve que certaines cellules amiboïdes, celles de la rate, par exemple, ont un pouvoir de sélection analogue. On injecta dans la veine latérale de l'oreille d'un lapin vivant une solution saturée de sulfindigotate de soude, jusqu'à ce que toutes les muqueuses fussent colorées en bleu foncé. Cette injection ne nuisit nullement à la santé de l'animal, ce sel n'ayant aucun effet toxique. 4 heures après on sacrifia l'animal par le chloroforme.

A l'autopsie le foie et les reins étaient d'un bleu foncé. L'intestin, au-dessous de l'ouverture du conduit biliaire, contenait une grande quantité de sel de soude, mais la rate était parfaitement normale. Des morceaux de poumon, de foie, de rein et de rate furent placés dans de l'alcool absolu, qu'on changea une heure après et le lendemain. A l'examen des coupes on trouva le sel bleu dans les cellules épithéliales des reins et du foie, mais on n'en trouva pas trace dans les leucocytes de la rate, du foie et du poumon. On voit donc que les leucocytes ne laissent

pas pénétrer toutes les substances chimiques qui les entourent.

Mais en admettant même que c'est la lymphe qui agit dans les leucocytes, M. Klein n'explique pas pourquoi on ne trouve de bacilles dégénérés que dans les leucocytes.

Voyons en effet ce qui se passe dans les cas où la phagocytose et l'exsudation sont bien marquées : quand, par exemple, on inocule le bacille de Chauveau à un cobaye. On observe assez souvent des signes de dégénérescence au point d'inoculation, mais les microbes dégénérés sont dans les leucocytes exclusivement. Dans le charbon, la diphtérie, la tuberculose, partout les bacilles présentant des signes de dégénérescence sont englobés dans les cellules et non pas libres. Si par conséquent la théorie du Dr Klein est juste, nous devrions conclure que les substances bactéricides, quoique présentes dans les humeurs, n'agissent qu'à l'intérieur des cellules.

Un peu plus loin, M. Klein dit que les cellules paraissent posséder une attraction chimique particulière pour les bactéries. On avait accepté jusqu'ici que ce sont, au contraire, les bactéries qui attirent les cellules, et on avait expliqué ainsi pourquoi des milliers de leucocytes émigraient aux points où étaient rassemblés les microbes. Il faut convenir que ce fait devient inexplicable si, comme le maintient M. Klein, ce sont les cellules qui attirent les bactéries.

Je laisse pour le moment de côté d'autres arguments de M. Klein qui sont en rapport moins immédiats avec le sujet de cet article. Ce qui précède suffit à juger la doctrine de ce savant d'après laquelle les leucocytes ne jouent aucun rôle dans la destruction des microbes.

Je reviens maintenant, pour les résumer, aux résultats de mes expériences.

Nous avons vu, chez les cobayes comme chez les lapins, que les bacilles du charbon symptomatique se développent aussitôt qu'ils sont introduits dans l'organisme, et que les leucocytes se rassemblent à l'endroit où se trouve le virus. De plus les leucocytes sont attirés par le poison chimique sécrété par les microbes, et, une fois émigrés, ils attaquent vivement ces derniers, les englobent et les détruisent. Il faut remarquer que l'émigration cellulaire, au point d'inoculation, varie inversement à la quantité

et à la force du virus introduit, mais est proportionnelle à la longueur et à la bénignité de la maladie. L'émigration des leucocytes est faible ou nulle quand on inocule une grande quantité de bacilles extrêmement virulents, devient plus marquée quand les bacilles inoculés sont peu nombreux ou qu'ils ont été affaiblis antérieurement.

En outre, si les leucocytes sont empêchés par une cause quelconque, mécanique ou chimique, d'aborder le virus, la maladie fait aussitôt des progrès et l'animal succombe. Cela est démontré par l'expérience où, après avoir laissé le virus sous la peau dans une enveloppe de papier à filtrer, on retire ou on rompt ce papier protecteur. De même quand les leucocytes sont arrêtés par l'acide lactique d'un côté du corps, la maladie ne se développe que de ce côté-là. De plus, les humeurs vivantes de l'animal naturellement réfractaire ou de l'animal dont l'immunité a été renforcée par une inoculation antérieure, n'a aucune action bactéricide sur le virus du charbon symptomatique, puisque ce même virus baigné dans ses humeurs, retiré et ensuite injecté à un animal réfractaire, lui donne la mort. Enfin les humeurs de l'animal malade ne paraissent pas avoir une action atténuante ou bactéricide sur le microbe de la même maladie.

Ce que je viens de dire au sujet de l'émigration cellulaire ne peut être en aucune façon appliqué à l'exsudation, autre phénomène qui accompagne l'inflammation. On serait plutôt porté à croire que les deux processus sont en relations inverses. Comparons par exemple l'exsudation sanguine d'un lapin, succombant en 12 heures à l'inoculation du bacille de Chauveau, et la substance épaisse, compacte, presque solide, qui s'accumule autour du virus inoculé à un animal réfractaire.

N'est-il pas évident que, dans cette maladie du moins, l'exsudation séreuse est toujours plus abondante quand la maladie est plus virulente? Mais, malgré la quantité énorme de cette exsudation, les microbes ne paraissent nullement en être nuisiblement affectés. Au contraire, ils y pullulent et acquièrent une virulence extraordinaire.

Un autre résultat très évident est que si les substances produites par les microbes ont déjà pénétré dans le sang, les poisons, sécrétés par le même microbe inoculé dans d'autres parties du corps de l'animal, n'attirent point les leucocytes. Les

résultats que j'ai obtenus avec le bacille pyocyanique en sont un exemple. Si l'on injecte une goutte de culture dans l'œil du lapin, les leucocytes émigrent en grande quantité au point d'injection. Mais si le poison, produit par le bacille pyocyanique, circule d'avance dans le sang, les leucocytes n'émigrent point, et l'œil reste intact. Il en est de même quand on injecte le charbon symptomatique simultanément dans les veines et sous la peau. Ce sont là des faits confirmant exactement les expériences de M. Bouchard [1] et de M. Roger.

Dans le cas du bacille pyocyanique, il y a des raisons pour croire que les leucocytes sont réellement paralysés : ainsi MM. Charrin et Gamaléia [2] ont démontré que, si l'on applique de l'huile de croton à l'oreille d'un lapin intoxiqué par les produits du bacille pyocyanique, on n'obtient point de réaction inflammatoire au point où l'huile de croton a été appliquée.

Cette explication n'est pourtant pas applicable aux résultats obtenus avec le bacille de Chauveau. Dans ce cas, les leucocytes sont très actifs dans les vaisseaux sanguins et la rate, mais complètement incapables d'émigrer dans les tissus environnants pour y attaquer les bacilles de la même espèce. Ils ne sont pourtant pas paralysés, car ils quittent les vaisseaux pour attaquer un autre bacille, notamment le bacille pyocyanique. C'est ainsi que les leucocytes d'un animal charbonneux refusent d'englober la bactéridie, tandis qu'ils avalent très bien tout autre microbe.

Il ne peut être question non plus d'un trouble vaso-dilatateur comme dans les expériences classiques de MM. Charrin et Gley Du reste je me plais à reconnaître que les expériences de ces savants sont parfaitement exactes, comme je viens de m'en assurer par moi-même.

Pour conclure, je dois avouer que les faits que je viens d'énumérer me semblent confirmer la théorie que MM. Massart et Bordet ont énoncée dans ces *Annales* [3]. Pourtant, il me semble qu'avant d'accepter la théorie de ces savants, il faut étudier l'action sur l'inflammation de certaines substances chimiques bien

1. Bouchard, *loco citato*, p. 12 et 13.
2. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, 2 juin 1890.
3. *Institut Pasteur*, 1891, p. 441.

définies, injectées en même temps sous la peau et dans les veines. Ce sera là l'objet d'un prochain travail.

La plus grande partie de ce travail a été exécutée dans les laboratoires réunis des collèges royaux de Londres. Je m'empresse d'exprimer mes remerciements à M. le Dr G. Sims-Woodhead, directeur de ces laboratoires. Quoique je sois seul responsable des faits et des théories exposés dans ce travail, c'est avec plaisir que je reconnais la grande utilité de la critique judicieuse et des conseils de M. le Dr Woodhead.

Sceaux. — Imp. Charaire et Cie.